

Részletes szakmai zárójelentés

1. Humán pluripotens őssejtek és ABC transzporterek

A projekt első évében, 2008-ban, elsőrendű feladatunk a humán embrionális őssejtek tenyésztésre és differenciáltatására alkalmas laboratóriumi körülmények megteremtése, valamint az őssejt-tuladonságokat és a differenciálódást jellemző markerek vizsgálatának beállítása volt. Ennek során létrehoztuk az első hazai laboratóriumot, amely megfelelő engedélyekkel rendelkezve alkalmas volt nemzetközi színvonalú humán pluripotens őssejtbiológiai munkák végzésére (lásd Apáti és mtsai, 2008). Mindez nélkülözhetetlen volt a membrán-transzporter vizsgálatok eredményes folytatásához a teljes projekt során.

Az őssejtek membrán-fehérjéinek elemzéséhez kidolgoztuk a megfelelő sejtszeparáló módszereket. Vizsgálatainkban párhuzamosan alkalmaztunk áramlási citometriás és fluoreszcens mikroszkópos rendszereket. Ugyancsak beállítottunk nagykapacitású kvantitatív RT-PCR vizsgálatokat az mRNS expressziós szintek meghatározása érdekében. Az őssejtekben új rendszert dolgoztunk ki a transzpozon-alapú génbevitelre, annak molekuláris szintű követésére és speciális promóterek alkalmazására (Orbán és mtsai, 2009). Ennek során bizonyítottuk, hogy egy speciális promóter rendszer alkalmazásával, amelyet “double feature” (“egyet fizet-kettőt kap”) rendszernek neveztünk el, mind a nem-differenciálódott őssejtek, mind a kardiomiocita irányban differenciálódott sejtek jól megkülönböztethetők, követhetők és kiválogathatók. Ezt a lehetőséget gyakorlati irányultságú projekteken is alkalmazni kezdtük, mivel így az őssejtekből nagy mennyiségben és hatékonyan válogathatók ki a differenciáltatás során nyert, gyógyszervizsgálatokra alkalmas emberi kardiomiociták.

A projekt során igazoltuk, hogy a humán embrionális őssejtekben az ABCG2 transzporter nagymértékben kifejeződik. A fehérje kifejeződése először emelkedik, majd jelentősen csökken a humán embrionális őssejtek kezdeti differenciálódása során. Megállapítottuk, hogy az ABCG2 mRNS használata is különbözik a nem-differenciálódott őssejtekben (Apáti és mtsai, 2008). Összehasonlító vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a számos vizsgált drog-transzporter fehérje közül az ABCG2 a humán embrionális őssejteken kifejeződő legjelentősebb xenobiotikum transzporter. Az

őssejtekben kifejeződő ABC transzporterek tekintetében nemzetközi szintű vita alakult ki, amelyben különleges szerepet kapott a nagyérzékenységű módszerek megfelelő használata. Ebben a vitában eredményesen megvédtük korábbi álláspontunkat, és további eredményekkel alátámasztottuk az ABCG2 funkcionális szerepét az emberi pluripotens őssejtekben (Sarkadi és mtsai, 2010).

A transzpozon-alapú génbevitel alkalmazása újdonságot jelentett az emberi pluripotens őssejtek genetikai módosításában, és új lehetőséget tárt fel a pontosan meghatározott kópiaszámú és genomiális helyzetű génbevitelre. Az ehhez kapcsolódó szakmai, metodikai és kísérleti eredményeket angol nyelven egy folyóiratközleményben (Kolacsek és mtsai, 2011), és egy könyvfejezetben (Orbán és mtsai, 2011) jelentettük meg. Átfogó angol nyelvű közleményt jelentettünk meg a humán pluripotens őssejtek gyógyszerfejlesztési és toxikológiai alkalmazásainak lehetőségéről egy nemzetközi folyóiratban (Szebeni és mtsai, 2011).

Az őssejtek vizsgálatához kapcsolódóan, a kutatások alapján a témavezetőt meghívták az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) keretében 2009-ben megalakult “Committee for Advanced Therapies” (Fejlett terápiás készítményeket vizsgáló bizottság) nevű szervezetbe, amelyben Londonban magyar delegátusként vesz részt a havi véleményező üléseken. Mivel a bizottság jelentős szakmai munkát is végez, a tevékenységet és a kihívásokat ismertető átfogó tanulmányt, amelyben a témavezető is szerzőtárs, a Nature Reviews in Drug Discoveries folyóirat jelentette meg (Schneider és mtsai, 2010).

II. ABC lipid transzporterek vizsgálata

A lipid anyagcserében szerepet játszó ABC transzporterek közül az ABCG1 és az ABCA1 transzporter vizsgálatában értünk el eredményeket, amelyeket nemzetközi folyóiratokban közzeltünk. Ugyancsak sor került ezen eredmények gyakorlati alkalmazására is.

Az ABCG1 az ABCG alcsaládba tartozó, homodimerizációt, illetve az ABCG4 fehérjével heterodimerizációt mutató transzporter. Munkánk során megállapítottuk, hogy az ABCG1 fehérje kifejeződése fontos szerepet játszik a sejtek apoptózis-indukciójában, valószínűleg a membrán lipidek destabilizációja révén (Seres és mtsai, 2008). Az

ABCG4 fehérje sejten belüli hatását, a heterodimerizáció biokémiai és funkcionális jellemzőit jelenleg is vizsgáljuk, ezen a téren egy közlemény előkészítés alatt áll.

Az ABCA1 membránfehérje az Apolipoprotein A-val lép kölcsönhatásba és a sejtekből történő koleszterin eltávolításban van fontos szerepe. Az ABCA1 sejten belüli lokalizációjának követésére új módszert (HA-epitóp címkézést) dolgoztunk ki. Igazoltuk, hogy a fehérje funkciója és membrán lokalizációja ebben az esetben megőrződik, és a címkézett fehérje eredményesen alkalmazható gyógyszerhatások vizsgálatában (Kasza et al, 2010). Ez a munka jelenleg is folytatódik, elsősorban gyakorlati, gyógyszervizsgálati alkalmazások területén.

III. ABC multidrog transzporterek daganatokban és daganat-össejtekben – funkcionális vizsgálatok

A projektben kiemelten vizsgáltuk a gyógyszerek hatásában, anyagcseréjében, az ellenük kifejeződő rezisztenciában szereplő ABC transzportereket. Követtük a daganatos sejtdifferenciálódás során bekövetkező molekuláris szintű változásokat, a gyógyszerek hatása és anyagcseréje tekintetében részletes elemzéseket adtunk a transzporterek és a drogok kölcsönhatásairól. A kísérleti munka során az ABCB1 (MDR1, PgP) fehérjével, és kiemelten az ABCG2 multidrog transzporter vizsgálatával foglalkoztunk. Erre elsősorban az adott motivációt, hogy ma már általánosan igazoltnak tekinthető az ABCG2 kiemelt jelentősége a daganat-össejtekben kialakuló gyógyszer-rezisztencia tekintetében (lásd Szakács és mtsai, 2008, Arias és mtsai, 2011).

Az ABCG2 fehérje homológia alapon az ABCG alcsaládba sorolható, homodimerizációt mutató multidrog transzporter fehérje. A molekuláris szintű biokémiai és funkcionális vizsgálatok érdekében előállítottuk és kifejeztettük az ABCG2 zöld fluoreszcens fehérjével (GFP-vel) címkézett változatát. Igazoltuk, hogy míg a C-terminálishoz kapcsolt GFP gátolja a fehérje működését, az N-terminálishoz kapcsolt GFP-nek nincs ilyen hatása – mind a funkció, mind a membrán lokalizáció megőrződik. Így az ilyen módon címkézett fehérje alkalmas a pontos lokalizáció és a funkció együttes vizsgálatára (Orbán és mtsai, 2008).

A GFP címkézett fehérje egyedülálló lehetőséget biztosított a fehérje transzport mechanizmusának vizsgálatára is. Ebben a rendszerben sikerült elemezni és matematikai modellekkel összevetve igazolni, hogy az ABCG2 transzporter közvetlenül a lipid kettősrétegből távolítja el az ott feldúsuló hidrofób drogot, a mitoxantront (Homolya és mtsai, 2011).

Az ABCG2 multidrog transzporter molekuláris átalakulásainak vizsgálatára különleges lehetőséget adott az a korábbi felismerésünk, hogy a fehérje sejtfelszíni epitópjával kölcsönhatásba lépő monoklonális ellenanyag (5D3) konformáció-függő kölcsönhatást mutat. Bizonyítottuk, hogy az 5D3 ellenanyag ABCG2-vel történő kölcsönhatása a fehérjén belüli intramolekuláris átrendeződések függvénye, míg az ABCG2 homodimerizáció (vagyis az intermolekuláris átrendeződés) nem befolyásolja a konformációs 5D3 epitóp változásait. Modellt alkottunk az 5D3 ellenanyaggal kölcsönhatásba lépő, sejtfelszíni fehérje hurok szerkezetére vonatkozóan is (Özvegy-Laczka és mtsai, 2008). Nemzetközi együttműködésekben új adatokat szolgáltatunk az ABCG2 biogenezise és katalitikus működése során kiemelkedő fontosságú molekuláris részek tekintetében is (Polgár és mtsai, 2009, Hou és mtsai, 2009). Részletesen elemeztük az ABCG2 multidrog transzporter szubsztrátokkal fellépő kölcsönhatásait (Nathwany és mtsai, 2009, Katona és mtsai, 2009, Proháczkova és mtsai, 2011).

A munka során részletesen elemeztük az ABCG2 multidrog transzporter és a célzott antitumor gyógyszerek kölcsönhatásait. A jelátviteli folyamatokat, és elsősorban a tirozin kináz enzimeket specifikusan gátló rákellenes szerek új lehetőségeket nyitnak meg a daganatok kezelésében, de az ellenük kialakuló rezisztenciában az ABC transzporterek is jelentős szerepet kapnak (áttekintő közleményekként lásd Szakács és mtsai, 2008, Hegedűs és mtsai, 2009a, 2009b). Megvizsgáltunk a legújabbban a kutatásból a klinikai alkalmazásba került olyan vegyületeket, amelyek a krónikus myeloid leukémiában a Bcr-Abl fehérje kóros tirozin kináz aktivitását gátolják, így eredményesen alkalmazhatók a leukémia gyógyításában. Megállapítottuk, hogy a második generációs gátlószerek egy része is kölcsönhatásba lép az ABCG2, illetve az ABCB1 fehérjével, így ezen transzporterek működése fontos lehet a gyógyszer-rezisztencia kialakításában (Hegedűs és mtsai, 2009c). Jelenleg folyó, még nem közölt munkáinkban elsősorban az EGFR

receptor tirozin kináz jelpályához kapcsolódó, már kutatási vagy klinikai alkalmazásban álló vegyületek kölcsönhatásait vizsgáljuk az ABCG2 fehérjével.

A közelmúltban a Nature hasábjain jelentős vita alakult ki arról, hogy az általános gyógyszerhatások, illetve toxikológiai hatások közvetítésében az aktív drog-transzporterek működése vagy a membránok passzív permeabilitása a meghatározó tényező. Szerkesztői felkérés alapján ehhez a vitához történő hozzászólásunk jelent meg a Nature Reviews in Drug Discovery folyóiratban (Sarkadi és Szakács, 2010). A tirozin kináz gátlók és a transzporterek kölcsönhatásairól, ugyancsak felkérés alapján jelent meg részletes szakmai áttekintő, véleményformáló közleményünk (Brózik és mtsai, 2011).

Hivatkozások:

Apáti A, Orbán TI, Varga N, Németh A, Schamberger A, Krizsik V, Erdélyi-Belle B, Homolya L, Várady G, Padányi R, Karászi E, Kemna EW, Német K, Sarkadi B. High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 1778, 2700-2709, (2008)

Arias, I.M., Saskia W. C. Van Mil, Heidrun Potschka, Alan S. Verkman, Uta Griesenbach, Eric W. F. W. Alton, Balazs Sarkadi and Gergely Szakacs: Chapter 14: Hot Topics, Recent Advances and Novel Approaches for Clinical Intervention. 5. The Role of ABC Multidrug Transporters in Normal and Cancer Stem Cells In: *The ABC Transporters*, Ed. K. Linton. In press (2011)

Brózik, A., Hegedűs, C., Erdei, Z., Hegedűs, T., Özvegy-Laczka, C., Szakács, G., and Sarkadi, B. Tyrosine Kinase Inhibitors as Modulators of ABC Multidrug Transporters: Substrates, Chemosensitizers or Inducers of Acquired Multidrug Resistance? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7(5) in press, (2011)

Greene LM, Nathwani SM, Bright SA, Fayne D, Croke A, Gargliardi M, Mc Elligott AM, O'Connor L, Carr M, Keely NO, O'Boyle NM, Carroll P, Sarkadi B, Conneally E, Lloyd DG, Lawler M, Meegan MJ, Zisterer DM. The vascular targeting agent Combretastatin-A4 and a novel cis-restricted {beta}-lactam analogue CA-432 induce apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells and in ex vivo patient samples including those displaying multidrug resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 335:302-13. (2010) .

Hegedűs C, Szakács, G., Homolya, L., Orbán, T.I., Telbisz, Á., Jani, M., and Sarkadi, B. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update of *in vitro* functional assays. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 47–56 (2009a)

Hegedűs, C, Özvegy-Laczka, C., Szakács, G., and Sarkadi, B. Interaction of anticancer protein kinase inhibitors with ABC multidrug transporters: substrates and/or inhibitors? *Current Cancer Drug Targets*, 9:252-272 (2009b)

Hegedűs, C., Özvegy-Laczka, C., Apáti, A., Magócsi, M., Német, K., Örfi, L., Kéri, G., Katona, M., Takáts, Z., Szakács, G., Sarkadi, B. Interaction of the second generation Bcr-Abl inhibitors nilotinib, dasatinib and bosutinib with the MDR1 and ABCG2 multidrug transporters. *Brit. J. Pharmacol.* 158:1153-1164. (2009c).

Homolya L, Orbán TI, Csanády L, Sarkadi B. Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1808:154-163. (2011)

Hou, Yue-xian; Li, Chang-Zhong; Palaniyandi, Kanagaraj; Magtibay, Paul; Homolya, Laszlo; Sarkadi, Balazs; Chang, Xiu-bao. Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport. *Biochemistry* 48, 9122-9131 (2009)

Kasza I, Hegyi Z, Szabó K, Andrikovics H, Németh K, Váradi A, Sarkadi B, Homolya L. Model system for the analysis of cell surface expression of human ABCA1. *BMC Cell Biol*. 10:93 (2010).

Katona M, Kiss K, Angyal V, Kucsma N, Sarkadi B, Takáts Z, Szakács G. A mass spectrometry based functional assay for the quantitative assessment of ABC transporter activity. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 23, 3372-3376. (2009)

Kolacsek, O., Krízsik, V., Schamberger, A., Erdei, Z., Apáti, Á., Várady, G., Mátés, L., Izsvák, Z., Ivics, Z., Sarkadi, B., and Orbán, T.I. Reliable transgene-independent method for determining *Sleeping Beauty* transposon copy numbers. *Mob. DNA*, In press (2011)

Nathwani SM, Butler S, Fayne D, McGovern NN, Sarkadi B, Meegan MJ, Lloyd DG, Campiani G, Lawler M, Williams DC, Zisterer DM. Novel microtubule-targeting agents, pyrrolo-1,5-benzoxazepines, induce apoptosis in multi-drug-resistant cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 66(3):585-596. (2010)

Orbán TI, Seres L, Ozvegy-Laczka C, Elkind NB, Sarkadi B, Homolya L.: Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 367, 667-73. Epub 2008 Jan 7. (2008)

Orbán, T, Apáti, A., Németh, A., Varga, N., Krízsik, V., Schamberger, A., Szebényi, K., Erdei, Z., Várady, G., Karászi, E., Homolya, L., Németh, K., Gócsa, E., Miskey, C., Mayes, L., Ivics, Z., Izsvák, Z., and Sarkadi, B. Applying a “double-feature” promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells*, 27, 1077-1087, (2009)

Orbán, T.I., Apáti, Á., Izsvák, Z., Ivics, Z., and Sarkadi, B. Use of the transposon-transposase system for stable genetic modification of embryonic stem cells. In : *Embryonic Stem Cells, Intech Books*, 953, (2011)

Ozvegy-Laczka C, Laczkó R, Hegedus C, Litman T, Várady G, Goda K, Hegedus T, Dokholyan NV, Sorrentino BP, Váradi A, Sarkadi B. Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J Biol Chem*. 283, 26059-26070. (2008)

Polgar O, Ediriwickrema LS, Robey RW, Sharma A, Hegde RS, Li Y, Xia D, Ward Y, Dean M, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B, Bates SE. Arginine 383 is a crucial residue in ABCG2 biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1788, 1434-1443. (2009)

Procházková, J., Kubala, L., Kotasová, H., Gudernová, I., Šrámková, Z., Pekarová, M., Sarkadi, B., and Pacherník, J. ABC transporters affect detection of intracellular oxidants by fluorescent probes. *Free Radical Research*, In press (2011)

Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Apáti A. Evaluation of ABCG2 Expression in Human Embryonic Stem Cells: Crossing the Same River Twice? *Stem Cells*. Stem Cells. 28:174-176 (2010)

Sarkadi B, Szakács G. Understanding transport through pharmacological barriers--are we there yet? *Nat Rev Drug Discov*. 9:897-898. (2010).

Schneider CK, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A, Haunerova I, Maimets T, Trouvin JH, Flory E, Tsiftoglou A, Sarkadi B, Gudmundsson K, O'Donovan M, Migliaccio G, Ancāns J, Mačiulaitis R, Robert JL, Samuel A, Ovelgönne JH, Hystad M, Fal AM, Lima BS, Moraru AS, Turčáni P, Zorec R, Ruiz S, Akerblom L, Narayanan G, Kent A, Bignami F, Dickson JG, Niederwieser D, Figuerola-Santos MA, Reischl IG, Beuneu C, Georgiev R, Vassiliou M, Pychova A, Clausen M, Methuen T, Lucas S, Schüssler-Lenz M, Kokkas V, Buzás Z, Macaleenan N, Galli MC, Linē A, Gulbinovic J, Berchem G, Frączek M, Menezes-Ferreira M, Vilceanu N, Hrubisko M, Marinko P, Timón M, Cheng W, Crosbie GA, Meade N, di Paola ML, Vandendriessche T, Ljungman P, D'Apote L, Oliver-Diaz O, Büttel I, Celis P. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov.* 9:195-201. (2010)

Seres L, Cserepes J, Elkind NB, Töröcsik D, Nagy L, Sarkadi B, Homolya L. Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim Biophys Acta.* 1778, 2378-2387 (2008)

Szakács, G., Váradi, A, Özvegy-Laczka, C, and Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*, 13, 379-93. (2008)

Szebényi, K., Erdei, Z., Péntek, A., Sebe, A., Orbán, T.I., Sarkadi, B., and Apáti, Á. Human pluripotent stem cells in pharmacological and toxicological screening: new perspectives for personalized medicine. *Personalized Medicine*, In press (2011)